

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 21720061152137

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

蜚蠊共附生放线菌的分离、活性筛选和化学成分研究

Study on the Isolation, Identification, Bioactivity Screening  
and Secondary Metabolites of Cockroach symbiotic  
actinomycetes

安然

指导教师姓名: 沈月毛 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2009 年 月

论文答辩日期: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 7 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在          年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：      年    月    日

导师签名：

日期：      年    月    日

## 目 录

摘 要 .....	I
ABSTRACT .....	III
1. 前 言 .....	1
1.1 放线菌与天然产物 .....	1
1.2 动物共附生微生物 .....	7
1.2.1 动物共附生微生物与宿主的关系 .....	7
1.2.2 动物共附生微生物的次级代谢产物研究概况 .....	7
1.3 昆虫共附生微生物 .....	12
1.3.1 共附生微生物与宿主昆虫的关系 .....	12
1.3.2 共生微生物对昆虫的作用 .....	13
1.3.3 昆虫共附生放线菌 .....	14
1.4 本课题研究的目的、意义及内容 .....	15
2. 材料与amp;方法 .....	17
2.1 材料 .....	17
2.1.1 蜚蠊（蟑螂） .....	17
2.1.2 指示菌 .....	17
2.1.3 常用微生物分离，发酵，产量及活性筛选培养基 .....	17
2.1.4 抗肿瘤活性测试常用肿瘤细胞株 .....	19
2.1.5 细胞培养基 .....	19
2.1.6 细胞培养及细胞毒活性测试 .....	19
2.1.7 次级代谢产物分离纯化中常用显色剂 .....	19
2.1.8 分子鉴定所用试剂 .....	19
2.1.9 化合物的分离纯化和结构测定中常用的溶剂 .....	20
2.1.10 主要试剂及耗材 .....	20
2.1.11 常用仪器 .....	20
2.2 方法 .....	21
2.2.1 技术路线 .....	21
2.2.2 蜚蠊共附生放线菌的分离 .....	22

2.2.3 菌株的分子生物学鉴定 .....	22
2.2.4 抗菌活性测定 .....	23
2.2.5 抗肿瘤性测定 .....	24
2.2.6 菌株发酵及粗提物的提取 .....	25
2.2.7 天然产物的分离纯化方法 .....	25
2.2.8 化合物的结构测定 .....	27
<b>3. 结果分析 .....</b>	<b>29</b>
3.1 蜚蠊共附生放线菌的分离 .....	29
3.2 放线菌抗菌活性的测定 .....	29
3.3 放线菌抗肿瘤活性的测定 .....	31
3.4 蜚蠊共附生放线菌菌株鉴定结果 .....	33
3.5 两株蜚蠊共附生放线菌的次级代谢产物的分离纯化 .....	33
3.5.1 菌株 .....	33
3.5.2 菌株 A2-7 的培养基筛选 .....	34
3.5.3 菌株 A2-7 30 L 高氏一号液体发酵罐发酵的次级代谢产物分离 .....	35
3.5.4 菌株 A2-7 10 L 高氏一号固体发酵的次级代谢产物分离 .....	39
3.5.5 菌株 A0-1 10 L 高氏一号固体发酵的次级代谢产物分离 .....	40
3.6 化合物的结构解析 .....	41
3.6.1 化合物 Q1B 和 Q26 .....	41
3.6.2 化合物 Q7 和 Q27 .....	45
3.6.3 化合物 Q10 .....	49
3.6.4 化合物 Q11 .....	51
3.6.5 化合物 Q16 .....	53
3.6.6 化合物 Q17 .....	54
3.6.7 化合物 Q19 .....	56
3.6.8 化合物 Q31 .....	58
3.6.9 化合物 Q42 .....	60
3.6.10 化合物 Q43 和 Q44 .....	62
3.6.11 化合物 Q47 .....	66
<b>4. 讨论与结论 .....</b>	<b>68</b>
4.1 蜚蠊共附生放线菌的分离 .....	68
4.2 放线菌抗菌及抗肿瘤活性测定 .....	68

4.3 菌株鉴定结果 .....	68
4.3 菌株 A2-7 培养基筛选结果 .....	69
4.4 两株放线菌次级代谢产物的研究 .....	69
5. 结论与展望.....	71
参考文献.....	73
致谢 .....	81

## CATALOG

ABSTRACT IN CHINESE.....	I
ABSTRACT.....	III
1. INRODUCTION.....	1
1.1 Actinomycetes and natrual compound .....	1
1.2 Animal symbiotic microbes.....	7
1.2.1 Animal symbiotic microbes with host.....	7
1.2.2 Secondary metabolites of Animal symbiotic microbes.....	7
1.3 Entomic symbiotic microbes .....	12
1.3.1 Entomic symbiotic microbes with host.....	12
1.3.2 The function of entomic symbiotic microbes .....	13
1.3.3 Entomic symbiotic actinomycetes.....	14
1.4 Purpose, significance and content of this thesis.....	15
2. MATERIALS AND METHODS.....	17
2. 1 Materials.....	17
2.1.1 Cockroach.....	17
2.1.2 Indicative microbes.....	17
2.1.3 Culture medium for microbes.....	17
2.1.4 Cell for antitumor test.....	19
2.1.5 Culture medium for cell.....	19
2.1.6 Cell culture and cytotoxicity test.....	19
2.1.7 Chromogenic reagents for secondary metabolites isolation.....	19
2.1.8 Reagent for molecular identification .....	19
2.1.9 Chemicals for purification and structure analysis .....	20
2.1.10 Reagent and other materials .....	20
2.1.11 Apparatus.....	20

<b>2. 2 Methods</b> .....	21
2.2.1 Technology Roadmap .....	21
2.2.2 Isolation of cockroach symbiotic actinomycetes .....	22
2.2.3 Identification of strains .....	22
2.2.4 Antimicrobial test.....	23
2.2.5 Antitumor test .....	24
2.2.6 Fermentation and extraction of strain .....	25
2.2.7 Purification of natural product.....	25
2.2.8 Structure analysis of the compound .....	27
<b>3. RESULTS.</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Isolation of cockroach symbiotic actinomycetes</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2 Antimicrobial test of the Actinomycetes</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 Antitumor test Actinomycetes</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4 Identification of strains</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5 Secondary metabolites purification of two strains</b> .....	<b>33</b>
3.5.1 Strains.....	33
3.5.2 Culture medium screening for strain A2-7 .....	34
3.5.3 Liquid fermentation and secondary metabolites isolation of strain A2-7 .....	35
3.5.4 Solid fermentation and secondary metabolites isolation of strain A2-7 .....	39
3.5.5 Solid fermentation and secondary metabolites isolation of strain A0-1 .....	40
<b>3.6 Structure analysis of the compounds</b> .....	<b>41</b>
3.6.1 Compound Q1B and Q26 .....	41
3.6.2 Compound Q7and Q27 .....	45
3.6.3 Compound Q10 .....	49
3.6.4 Compound Q11 .....	51
3.6.5 Compound Q16.....	53
3.6.6 Compound Q17 .....	54
3.6.7 Compound Q19.....	56



3.6.8 Compound Q31 .....	58
3.6.9 Compound Q42 .....	60
3.6.10 Compound Q43 and Q44 .....	错误！未定义书签。
3.6.11 Compound Q47 .....	错误！未定义书签。
4. DISCUSSION AND SUMMURAY .....	错误！未定义书签。
4.1 Isolation of cockroach symbiotic actinomycetes .....	错误！未定义书签。
4.2 Antimicrobial test and antitumor test .....	错误！未定义书签。
4.3 Strain identification .....	错误！未定义书签。
4.3 Culture medium screening for strain A2-7 .....	错误！未定义书签。
4.4 Secondary metabolites purification of the strains .....	错误！未定义书签。
5. CONCLUSION AND PROSPECT .....	错误！未定义书签。
REFERENCES .....	错误！未定义书签。
ACKNOWLEDGEMENT .....	81

## 摘 要

天然产物是药物的重要来源。许多常用的临床药物均来自于微生物次级代谢产物。其中放线菌(*Actinomycetes*)在产生抗生素方面具有独特的优势,大约75%的抗生素都是由放线菌产生。从动物共附生微生物可以分离到许多结构新颖,生物活性多样的化合物。而昆虫共附生放线菌及其次级代谢产物的研究是一个新的领域。有可能对新药的研究及解决抗药性问题起到巨大的推动作用。

本论文对采集自厦门大学学生宿舍的蜚蠊进行体内(分为肠道和其他内脏)共附生放线菌的分离,共分离到 50 株放线菌。并对分离到的菌株进行了分子鉴定,通过 16S rDNA 的序列分析,结果表明所有菌株均属于链霉菌属。

以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、白色假丝酵母(*Candida albicans*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)为指示菌,采用牛津杯法对这些菌株进行抗菌活性检测,共筛选得到活性菌株 15 株,占总菌株数的 30%,其中主要是抗革兰氏阳性细菌的活性,但活性都较弱;采用 MTT 法对其体外抗肿瘤活性进行检测,发现有 39 株放线菌对 HeLa(人子宫癌细胞)具有抑制作用,占总菌株数的 78%,其中有 15 株放线菌对 HeLa(人子宫癌细胞)有很强的抑制作用,占总菌株数的 30%。

本论文对两株具有较强抗肿瘤活性的链霉菌菌株 A2-7 和 A0-1 的次级代谢产物进行了初步研究。从菌株 A2-7 的液体发酵产物中分离并鉴定了 9 个化合物,其中 4 个为新化合物, Q7、Q19 和 Q27 为杂合萜类, Q10 为呋喃酸类。5 个为已知化合物, Q1B 和 Q26 为呋喃酮类物质, Q11 为苯乙酸苯酯类物质, Q16 为饱和脂肪酸类物质, Q17 为吡啶类物质;另外,从菌株 A2-7 的固体发酵产物中分离到并鉴定了 1 个已知化合物 Q31,为苯乙酰氨基类物质。从菌株 A0-1 的固体发酵产物中分离并鉴定了 4 个已知化合物,其中 Q42 为氨基酸类物质, Q43 和 Q44 为萘醌类物质, Q47 为羟基苯乙酮类物质。

对新化合物 Q7、Q10、Q19 和 Q27 的抗菌活性及抗肿瘤活性进行了研究,在样品浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$  时,用 MIC 法测定抗菌活性,对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、白色假丝酵母(*Candida albicans*)和黑曲霉 5 种指示菌, 4 个化合物均没有显示出明显的抗菌活性。抗肿瘤实验结果显示, 在样品浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$  样品没有显示出抗肿瘤活性。

本文结果表明, 蜚蠊共附生放线菌中包含有抗菌和抗肿瘤活性的菌株, 而这些菌株的次级代谢产物类型丰富, 其中有抗菌和抗肿瘤活性物质, 同时也蕴藏着较丰富的结构新颖的活性物质, 研究昆虫共附生放线菌可能为开发新的抗菌、抗肿瘤药物奠定基础。

关键词: 蜚蠊; 共附生放线菌; 活性筛选; 次级代谢产物; 结构

## Abstract

Nature products are important source of Medicine. Many important clinical medicine are microbial secondary metabolites. Actinomycetes have a distinguished advantage in the field of producing antibiotics. About 75% of antibiotics are produced by actinomycetes. Many types of novel compound with good biological activities are found from animal symbiotic microbes. And entomic symbiotic actinomycete and its secondary metabolite is a new area for scientists. By studying entomic symbiotic actinomycete, we may find new medicine candidates and it may also help us to solve the problem of resistant pathogen.

In this thesis, actinomycetes are isolated from cockroaches which are captured in students' dormitory. 50 strains of actinomycetes are isolated from intestine and other purtenance. By molecular identification, and compare the 16S rDNA sequence online. All isolated actinomycetes belong to genus *streptomyces*.

In antimicrobial activity test, 15 stains (30% of the total number) showed antimicrobial activities against one or more sensitive microbes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Staphlococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*). But all 15 strains have weak antimicrobial activities. In antitumor acitivity test, 39 strains (78% of the total number) showed inhibition to the growth of HeLa cells. 15(30% of the total number) of them showed very strong inhibition to the growth of HeLa cells.

In this thesis, the study of secondary metabolites was carried on the two selected strains (A2-7 and A0-1), which have strong inhibition to HeLa cells. With liquid fermentation, 9 compounds were isolated from strain A2-7. 4 of them are novel compound. Q7, Q19 and Q27 are terpenoid. Q10 is furoic acid. The other 5 compounds are known compounds. Q1B and Q26 are furanone, Q11 is benzeneacetic Acid Phenyl Ester, Q16 is fatty acid, Q17 is indole derivate. With solid fermentation, only 1 known compound was isolated form

strain A2-7, Q31 is benzeneacetamide. With solid fermentation, 4 known compounds were isolated from strain A0-1. Q42 is amino acid, Q43 and Q44 are anthraquinone, Q47 is hydroxyl acetophenone.

In the antimicrobial and antitumor tests of isolated novel compounds, none of the compounds showed antimicrobial activity and antitumor activity.

The study on the cockroach symbiotic actinomycetes and their secondary metabolites indicated cockroach symbiotic actinomycetes have antimicrobial activity and antitumor activity. And the secondary metabolites are abundant in types. Some of them have antimicrobial activity or antitumor activity. And they might be new sources for novel compound with good biological activity. The study on entomic symbiotic actinomycetes may help in developing new antimicrobial and antitumor medicine.

**Key words:** cockroach; symbiotic actinomycetes; bioactivity screening; secondary metabolites; structure.

## 1. 前言

### 1.1 放线菌与天然产物

新药主要来源于天然产物<sup>[1, 2]</sup>和经化学合成或修饰<sup>[3, 4]</sup>的化合物。其中天然产物一直是新药最重要的来源。天然产物在药物的发现和发展的过程中发挥了重要的作用<sup>[5]</sup>。青霉素（penicillins）、头孢菌素（cephalosporins）、四环素（tetracyclines）、大环内酯类抗生素（macrolides）等最常用的临床药物均来自于微生物次级代谢产物<sup>[6, 7]</sup>。据美国调查机构对 1983-1994 年每年新应用的新药的调查报告显示，60-75%的抗癌药和抗感染药最初都来源于天然产物<sup>[8]</sup>。

微生物起源久远、生境丰富，次级代谢产物的结构和生物活性的多样性，使其成为天然产物的主要来源。所谓微生物的次级代谢产物，主要是指不同于初级代谢产物的，非微生物的生长繁殖所必须的代谢产物，在自然界中可能对微生物的进化和生态系统起着非常重要的作用。在过去的十几年中，对微生物活性次级代谢产物的研究进展迅速。上个世纪 70 年代，每年大约发现 200~300 个新的微生物活性次级代谢产物，而 90 年代这个数字增加到约 500 个<sup>[9]</sup>。导致这种进步的原因是多方面的：日趋成熟的化学分离分析技术、层出不穷的生物活性筛选模型、高效合理的筛选策略、强大的生物及化学合成技术、不断进步微生物样品采集和纯培养技术、日益完善的知识产权保护等均在推动着微生物次级代谢产物研究的高速发展。

放线菌属于需氧的革兰氏阳性细菌，在分类学上被认为是广义细菌中的1个目——放线菌目。大多有基内菌丝和气生菌丝，少数无气生菌丝，多数产生分生孢子，有些形成孢囊和孢囊孢子。绝大多数放线菌革兰氏染色呈阳性。在形态、生理和生化上都有别于其他的革兰氏阳性细菌，其GC含量占整个碱基总数的69-78%。

在微生物中，放线菌是天然产物研究的重要类群。原核微生物53个门中，只有5个门能产生各种生物活性化合物的。在这5个门中，放线菌门的放线菌目（Actinomycetales）的微生物（通常称为放线菌）产生了大约7000个具有抗菌、抗肿瘤等活性的化合物，而其中的80%是由链霉菌产生的。放线菌具有无可比拟的生物合成能力，在已知的抗生素、抗肿瘤药物、酶抑制剂和免疫抑制剂等有生物活

性的次级代谢产物中有一半都来自放线菌<sup>[10, 11]</sup>。其中放线菌(*Actinomycetes*)在产生抗生素方面具有独特的优势, 大约75%的抗生素是由放线菌产生, 而其中的75%又是由链霉菌属(*Streptomyces*)产生<sup>[12]</sup>。

1943 年, 美国科学家 Waksman 从放线菌中发现链霉素, 给当时被视为不治之症的结核病人带来了福音, 造就了放线菌的研究和抗生素的蓬勃发展。后来又陆续从放线菌中发现了新霉素(1949 年)、土霉素(1950 年)、红霉素(1952 年)、四环素(1953 年)等<sup>[13]</sup>。对放线菌研究使得更多的有用的天然产物不断被发现和报道, 从诺卡氏菌属中分离到的 Brasilidine A, 属于吲哚生物碱, 带有独特的共轭三烯和乙氧单元, 在体外实验中表现出抗多种肿瘤细胞的活性, 该化合物还具有抗革兰氏阳性菌和多种真菌的活性, 尤其是对曲霉(*Aspergillus niger*)和分枝菌属(*Mycobacterium smegmatis*)表现出强抗菌活性, 其 MIC 分别是 0.39  $\mu\text{g/ml}$  和 0.78  $\mu\text{g/m}$ <sup>[14, 15]</sup>。

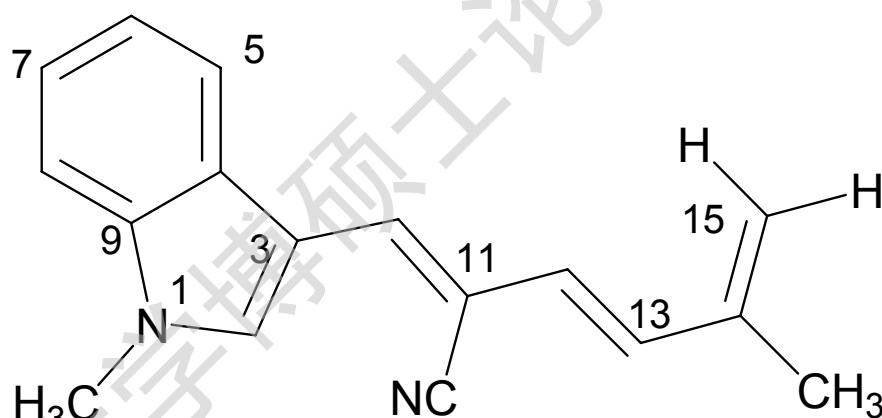


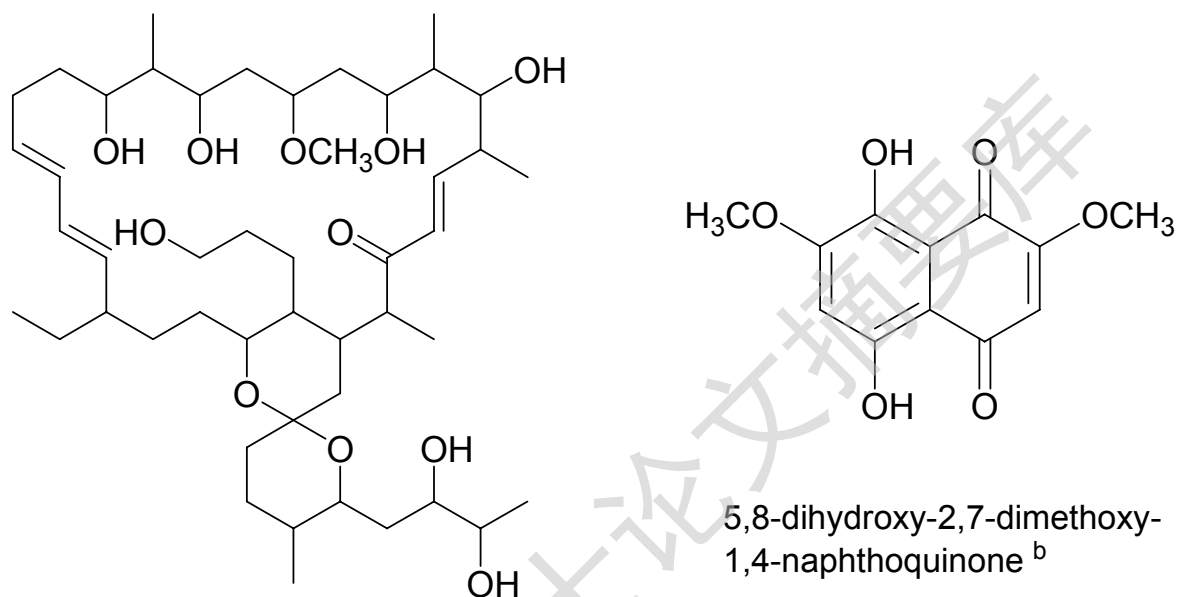
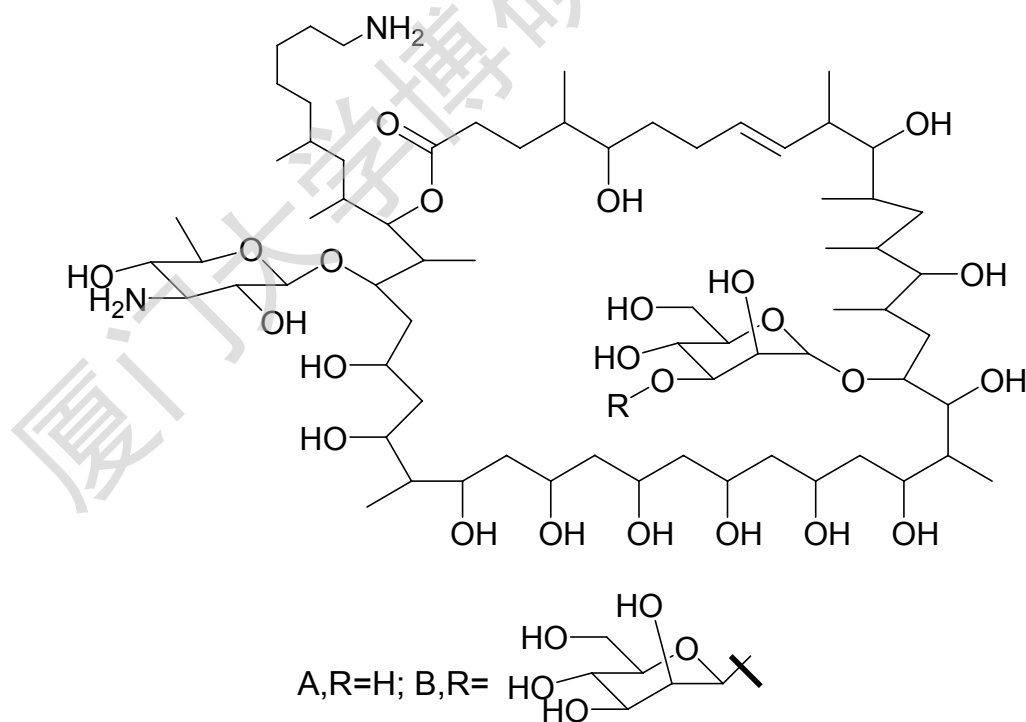
图1-1 化合物Brasilidine A 的结构

Fig.1-1 The structure of Brasilidine A

资料来源: Junichi Kobayashi, Masashi Tsuda, Akira Nemoto et al. Brasilidine A, a New Cytotoxic Isonitrile-Containing Indole Alkaloid from the Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. [J]. J. Nat. Prod., 1997, 60: 719-720.

从放线菌 *Actinomycete* sp.Y8521050 中分离得到寡霉素族的 Maclafungin, 该化合物对丝状真菌如镰刀菌的活性强于酵母菌如白色假丝酵母<sup>[16]</sup>; 从放线菌 HILY-8620959 中分离得到的 Mathemycin B 对多种植物病原真菌有一定的抗菌活性<sup>[17]</sup>; 从一株不产孢的链霉菌 *Streptomyces* sp. No.12396

中分离得到的 5,8-dihydroxy-2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone，是一种具有一定抗革兰氏阳性细菌和真菌活性的萘醌类化合物<sup>[18]</sup>。从一株分离自姜的根部的链霉菌 *aureofaciens* CMUAc130 中<sup>[19]</sup>，分离到两个苯基香豆素类化合物 A 和 B，这两个化合物具有抗真菌活性。

Maclafungin <sup>a</sup>Mathemycin A,B <sup>c</sup>



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库